

DER SÄURESTABILE TRYPSININHIBITOR
IM SERUM DES SCHWEINES
SEINE VORSTUFE UND SEINE ABKÖMMLINGE

RUDOLF SCHNEIDER

1901

Dissertations- und Fotodruck . ANNELIESE SCHUBERT
Corneliusstraße 21 · 8000 München 5 · Telefon 2014774



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553807_0015

Aus dem Biochemischen Laboratorium (Leitung: Prof. Dr. K. Hochstraßer)
der Hals-Nasen-Ohrenklinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. H. H. Naumann

Der säurestabile Trypsininhibitor im Serum des Schweines.
Seine Vorstufe und seine Abkömmlinge.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Rudolf Schneider
aus
Pfarrkirchen

1981

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. K. Hochstraßer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. H. Naumann

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 25.11.1981



Inhaltsübersicht

I. Einleitung	1
II. Allgemeiner Teil	
1. Bedeutung der Proteinase-Inhibitoren	3
2. Aufbau und Eigenschaften der Proteinase-Inhibitoren	4
3. Wirkungsweise der Proteinase-Inhibitoren	5
4. Die Festigkeit der Proteinase-Inhibitor-Bindung	4
5. Proteinase-Inhibitoren des menschlichen Serums	7
III. Spezieller Teil	
1. Die säurestabile Inhibitoraktivität des menschlichen Serums und Urines	11
2. Der HI-30	11
3. Der ITI als Prekursor des HI-30	13
4. Die Einzigartigkeit des ITI - HI-30 -Systems	13
5. Künstliche vom ITI abgeleitete säurestabile Inhibitoren	13
6. Veränderungen im ITI - HI-30 -System bei verschiedenen Erkrankungen	18
7. ITI - spaltende Proteasen	19
8. Zielsetzung der Untersuchungen am Serum des Schweines	20

IV. Ergebnisse

1. Der natürliche säurestabile Trypsin-Inhibitor im Serum des Schweines	21
2. Enzymatisch freilegbare säurestabile Inhibitoren als Nachweis eines ITI-analogen Proteins im Serum des Schweines	21
3. Der P-ITI als Proinhibitor des PI-30	25
4. Aminosäurezusammensetzung und teilweise Primärstruktur des PI-14	27
5. Identifizierung des PI-14 als doppelköpfigen Trypsin-Elastase-Inhibitor	30

V. Material und Methoden	32
--------------------------	----

VI. Zusammenfassung	39
---------------------	----

Literaturverzeichnis	40
----------------------	----

I. Einleitung

Energiegewinnung und Aufbau von körpereigener Substanz ist Voraussetzung für jedes Leben. Dazu ist es notwendig, daß in jedem Organismus eine große Anzahl chemischer Prozesse abläuft.

Enzyme ermöglichen als Katalysatoren den in seiner Gesamtheit als Stoffwechsel bezeichneten Substratumsatz.

Für ein Funktionieren des Gesamtorganismus ist ein sinnvolles Zusammenwirken aller Teilabläufe notwendig. Diese müssen genau koordiniert und bedarfsangepasst sein und dürfen sich gegenseitig nicht stören. Die dazu notwendige Regulation geschieht überwiegend durch auf die jeweils beteiligten Enzyme einflußnehmenden Mechanismen.

Durch Kompartimentierung, d.h. bestimmte Enzymsysteme kommen nur in bestimmten Zellarten oder innerhalb der Zelle nur in abgegrenzten Bereichen, den sog. Organellen, vor, wird eine gegenseitige Störung von zum Teil über gleiche Zwischenprodukte ablaufenden Reaktionen vermieden.

Von Enzyminduktion wird gesprochen, wenn durch direkte Einflußnahme auf bestimmte Gene deren Aktivität erhöht wird und dadurch die Mehrproduktion eines entsprechenden Enzymes ausgelöst wird. In der Rolle der diesen Vorgang auslösenden Induktoren entfalten Hormone ihre Wirkung. Unter den Bedingungen des Fließgleichgewichtes kann über die Menge des Katalysators auch der Stoffumsatz reguliert werden. Die Modifikation der Aktivität eines Schlüsselenzymes ist eine weitere Möglichkeit der Steuerung von biologischen Prozessen. Bei der hierauf beruhenden allosterischen Kontrolle wird das Ferment durch ein Substrat, ein Zwischen- oder Endprodukt des zugehörigen Teilablaufes, aktiviert oder gehemmt.

Die Funktion des die Enzymaktivität regulierenden Agens kann auch von Kontrollenzymen ausgehen, die ihrerseits wieder hormoneller Steuerung unterliegen.

Die Bildung spezieller Inhibitoren ist eine weitere Möglichkeit, Enzyme in ihrer Wirkung gezielt zu begrenzen und damit steuernd Einfluß auf sie zu nehmen. Es sind die für sehr viele biologische Vorgänge sehr wichtigen eiweißspaltenden Fermente, die durch sog. Proteinaseinhibitoren in ihrem Wirkungsumfang reguliert werden.

II. Allgemeiner Teil

1.) Die Bedeutung der Proteinaseninhibitoren

Eiweißspaltende Enzyme, sog. Proteasen, spielen in der gesamten belebten Natur eine wichtige Rolle. Jeder Organismus bedient sich ihrer in irgend einer Weise, sei es zur Spaltung von Nahrungseiweiß, zum Abbau von gealterten Strukturbestandteilen oder in der Auseinandersetzung mit anderen Lebewesen. Fast überall wo Proteinasen wirksam werden, sind sie mit ihren Inhibitoren vergesellschaftet. Diese Proteinaseninhibitoren werden von allen Formen von Organismen gebildet. Sie können aus Bakterienkulturen isoliert werden, sind in Pflanzen und deren Samen zu finden und sind in den Geweben und Körpersäften höherer Lebewesen anzutreffen. Sie erfüllen verschiedene regulative Funktionen. Eine räumliche Begrenzung der eiweißspaltenden Wirkung auf die Nahrung und eine Vermeidung der Schädigung der Drüsenfunktionsgänge wird im Pankreas und in tierischen Speicheldrüsen durch gleichzeitig mit den Verdauungssäften ausgeschiedene Proteinaseninhibitoren erreicht. Eine quantitativ regulierende Funktion fällt speziellen PIs im Blutgerinnungssystem zu. Sowohl im gerinselbildenden System als auch im fibrinolytischen System verhindern sie eine überschießende Reaktion. Die Unterdrückung von Enzymwirkungen für einen bestimmten Zeitraum bewirken die PIs in Pflanzensamen. Hier halten sie die latente Lebensform bis zur Keimung aufrecht und verschwinden dann.

Bei der Auseinandersetzung mit anderen Lebewesen erfüllen die PIs die Abwehrfunktionen. Bakterien und Pilze bedienen sich bei ihrem Eindringen in Wirtsorganismen proteolytischer Enzyme, PIs in der Zwischenzellflüssigkeit und im Blut stehen ihnen entgegen.

Die Keime ihrerseits schützen sich durch eigene Inhibitoren gegen die Wirkung der Proteasen der Abwehrzellen.

PIs haben jedoch im Kampf der Lebewesen untereinander nicht immer nur die defensive Rolle. Verschiedene Schlangengifte entfalten ihre letale Wirkung durch Blockierung lebenswichtiger Serumproteasensysteme durch spezielle PIs.

2.) Aufbau und Eigenschaften der Proteinaseinhibitoren

PIs sind Proteine oder Peptide, die aufgrund ihrer besonderen Struktur in der Lage sind, mit eiweißspaltenden Enzymen Komplexe zu bilden. Dabei wird deren katalytische Aktivität reversibel oder irreversibel aufgehoben. Die Wirksamkeit beschränkt sich bei den sog. monovalenten auf eine einzige Protease, bei den polyvalenten erstreckt sie sich auf mehrere oder auch sehr viele verschiedene Proteasen. Als reaktives Zentrum wird derjenige Molekülort des Inhibitors bezeichnet, der mit dem aktiven Zentrum der Protease in Wechselbeziehung tritt, es kann von Lysin oder Arginin gebildet werden. Die meisten der bekannten Inhibitoren weisen nur ein solches reaktives Zentrum auf und bilden dementsprechend 1 : 1 Komplexe mit den Proteasen. Es sind jedoch auch Inhibitoren mit mehreren reaktiven Zentren bekannt, die zudem noch unterschiedliche Wirkungsspektren haben können und gleichzeitig mehrere Proteasen zu hemmen vermögen.

PIs weisen eine hohe Resistenz gegen proteolytischen Abbau auf. Bei einigen Trypsininhibitoren konnte gezeigt werden, daß große Bereiche innerhalb der AS-Sequenz frei sind von tryptisch spaltbaren Peptidbindungen. Es ist anzunehmen, daß diese unangreifbaren Sequenzabschnitte an der Oberfläche des Moleküles liegen.

Die Tertiärstruktur ist auch für die Funktion des reaktiven Zentrums von großer Bedeutung. Veränderung der Molekülfaltung durch Reduktion der Disulfidbrücken oder Auflösung der Wasserstoffbrücken bringt den Verlust der Hemmwirkung und der Resistenz gegen proteolytischen Abbau mit sich (13,14).

Die Molekülgrößen der PIs umfassen ein sehr weites Spektrum. Mit einem MG von 820 000 ist der größte Vertreter dieser Stoffklasse (alpha-2-Makroglobulin) um mehr als 100 mal schwerer als die kleinsten aus Geweben höherer Lebewesen isolierten PIs mit einem MG von 6 000. In Schlangengiften und aus Bakterienkulturen gefundene PIs bestehen lediglich aus wenigen Aminosäuren und weisen dementsprechend Molekulargewichte von unter 1 000 auf (11,12).

3.) Wirkungsweisen der Proteinaseinhibitoren

Alle bisher bekannten Proteinaseinhibitoren wirken kompetitiv hemmend, d.h. sie konkurrieren mit dem Substrat um die Bindung an das aktive Zentrum des Enzymes. Für die Enzym-Substratinteraktion wird nach der Theorie von Michaelis und Menten ein in mehrere Schritte unterteilbarer Reaktionsablauf angenommen. Aus Enzym und Substrat bildet sich zunächst durch Anlagerung der Enzym-Substratkomplex ($E + S \rightarrow ES$), dieser geht beim Stattfinden der jeweiligen katalytischen Reaktion über in den Enzym-Produktkomplex ($ES \rightarrow EP_1P_2$), im letzten Reaktionsschritt dissoziieren die Produkte ab und das Enzym wird wieder frei ($EP_1P_2 \rightarrow E + P_1 + P_2$) (16).

Tritt ein Inhibitor an die Stelle des Substrates wird von einem ähnlichen Denkmodell ausgegangen, hier muß natürlich der o.g. Reaktionsablauf spätestens vor der Abdissoziation von Reaktionsprodukten unterbrochen sein.

Diskutiert wurde für die Inhibitor-Enzym-Wechselwirkung eine einfache Aneinanderlagerung in Form des Michaeliskomplexes ohne jegliche chemische Veränderung. Denkbar wäre auch das Stattfinden einer Spaltungsreaktion und damit der Übergang in eine Art Enzym-Produktkomplex, wobei die entstandenen Produkte keine Tendenz zur Abdissoziation haben dürfen. Huber und Janin konnten für bestimmte Trypsininhibitorkomplexe zeigen, daß sie als Mittelding der beiden genannten möglichen Formen vorliegen. Bei dieser sog. Tetrahedral-Zwischenstufe bleiben die Peptidbindungen im reaktiven Zentrum des Inhibitors intakt, es bildet sich jedoch eine kovalente Bindung zwischen dem Serinrest des Enzymes und der Carbonylgruppe des Lysyl- oder Arginylrestes der reaktiven Seite des Inhibitors (15).

4.) Die Festigkeit der Proteasen-Inhibitorbindung

Alle Proteasen-Inhibitorbindungen sind durch eine außergewöhnliche Festigkeit gekennzeichnet. Die Affinität zwischen Inhibitor und Proteasen liegen in der Regel um ein bis mehrere Zehnerpotenzen höher als die zwischen Protease und zugehörigem Substrat. Bei der Konkurrenz um die Anlagerung an das aktive Zentrum ist dies für den meist in erheblich niedrigerer Konzentration vorliegenden Inhibitor notwendig um wirksam werden zu können.

Die geringe Dissoziationsneigung wird nicht etwa durch eine große Zahl von Bindungen bewirkt, da lediglich vier oder fünf Aminosäuren miteinander in Wechselbeziehung treten (15). Die Besonderheit der Enzym-Inhibitorinteraktion scheint vielmehr darin zu liegen, daß durch strukturelle Eigenschaften des Inhibitormoleküles die gesamte Bindungsenergie frei wird und nicht an gleichzeitig ablaufende endotherme Prozesse verschwendet wird.

Durch die Starrheit des Inhibitors wird bei der Bindung an die Protease keine Energie für die Aufhebung innerer Freiheitsgrade des Moleküles verbraucht. Daß dies eine wesentliche Rolle spielt, konnte an Untersuchungen von Homoargininpeptiden gezeigt werden (18). Mit zunehmender Peptidlänge fällt hier die Affinität parallel zur zunehmenden Rotationsenergie des Peptides, die bei der Bindung aufgehoben werden muß. Weiter ist die hohe präfermierte Paßgenauigkeit des reaktiven Zentrums von wesentlicher Bedeutung. Durch das Ineinanderpassen wie ein Schlüssel ins Schloß wird keine Energie für die bei der Anlagerung von Substraten notwendige induzierte Anpassung der Struktur verbraucht.

5.) Die Proteinaseinhibitoren des menschlichen Serums

Im menschlichen Serum werden mindestens sechs verschiedene PIs wirksam; alpha-1-Antitrypsin, alpha-1-Antischymotrypsin, Inter-alpha-Trypsininhibitor, Antithrombin III, C1-Inaktivator und alpha-2-Makroglobulin. Sie alle sind Glykoproteine (18). Bis auf alpha-1-Antichymotrypsin, das nur Chymotrypsin und Kathepsin G hemmt, weisen sie alle ein polyvalentes Wirkungsspektrum auf. Die Blutgerinnung, die Fibrinolyse, die Kininfreisetzung und die Komplementbildung sind biologische Systeme, die durch Aktivierung von proteolytischen Enzymen ablaufen. Alle hierbei wirksamen Faktoren werden von PIs kontrolliert.

Durch Transsudation gelangen die Serumproteasen in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht in unterschiedlichem in andere Kompartimente des Körpers, sie sind in der interstitiellen Flüssigkeit, in den Sekreten der Schleimhäute, und in der Gelenkflüssigkeit zu finden. Diese Gewebegängigkeit kann sich bei krankhaften Zuständen erheblich steigern (18,19).

Alpha-1-Antitrypsin ist verantwortlich für 90 % der trypsinhemmenden Wirkung des menschlichen Plasmas. Durch sein relativ niedriges MG von 54 000 gelangt es durch Transsudation in großem Umfang in die Interzellulärflüssigkeit (20). Die Hemmwirkung dieses Polyvalenten Inhibitors erstreckt sich auf Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin, Pankreaskallikrein und Leukozytenproteasen. In der Elektrophorese wandert es als alpha-1-Globulin und stellt den Hauptanteil dieser Serumfraktion. Es ist verantwortlich für die Vermehrung der alpha-1-Globuline bei entzündlichen und neoplastischen Erkrankungen. Als genetischen Polymorphismus findet man mindestens 21 verschiedene Phänotypen (21). Laurell fand, daß ein bestimmter Genotypus mit einem Mangel an alpha-1-Antitrypsin einhergeht.

Dies wurde von besonderer Bedeutung, als Eriksson bei diesen Individuen ein erheblich gehäuftes und verfrühtes Auftreten von chronisch obstruktivem Lungenemphysem feststellte. Es ist anzunehmen, daß diese Krankheitsentstehung ihre Ursache in dem durch Inhibitormangel unzureichenden Schutz der Lungenstrukturen vor bei der Keimabwehr freiwerdenden leukozytären Proteasen hat. Zwischenzeitlich konnten mit immunologischen Methoden Komplexe von Leukozytenelastase mit alpha-1-Antitrypsin im Bronchialsekret nachgewiesen werden. (22).

Der C1-Inaktivator hemmt einige der Gerinnungsfaktoren, Plasmin und Faktoren des Komplements sowie progressiv Plasmakallikrein (10). Besondere Bedeutung erhält der C1 INA durch seine Inhibition des aktivierten Hagemannfaktors. Dieser steht an der sterblichsten Stelle des endogenen Gerinnungssystems, zudem wirkt er als Prekallikreinaktivator und Plasma-inaktivator und hat indirekt auslösende Wirkung auf die Komplementaktivierung.

Durch Hemmung dieses Faktors XIIa beeinflußt der C1-Inaktivator eines der wichtigsten Mediatorsysteme in der frühesten Phase (18). Von verschiedenen Untersuchern konnte gezeigt werden, daß ein Mangel an C1-Inaktivator oder dessen Dysfunktion bei den betroffenen Individuen das Auftreten angioneurotischer Ödeme bedingt. Dies ist eine Erkrankung mit intermittierendem Erscheinen von umschriebenen subcutanen oder submukösen Schwellungen, ausgelöst durch temporäre Gefäßschränkungen mit vermehrter Flüssigkeitsansammlung im Gewebe (23).

Antithrombin III entfaltet ausschließlich innerhalb des Blutgerinnungssystems Wirkung. Es ist ein starker Hemmstoff des aktivierten Stuartfaktors (24), gegen Thrombin wirkt es progressiv hemmend. D. h. Thrombin wird durch Antithrombin III alleine zunächst nur geringfügig und erst nach einer Anlaufzeit in größerem Umfange gehemmt. Durch die gleichzeitige Anwesenheit von Heparin wird die Hemmung in eine Sofortreaktion umgewandelt. Das Antithrombin III übernimmt dabei die Funktion des Heparin-Co-Faktors. Ein Verbrauch dieses Inhibitors zeigt sich bei Zuständen erhöhten Gerinnungsfaktorenumsatzes insbesondere bei der disseminierten intravasalen Koagulopathie (26). Familiär gehäuft auftretende Mangelerkrankungen sind bekannt geworden, bei den Merkmalsträgern wurde eine erhöhte Neigung zu thrombotischen Erkrankungen nachgewiesen (25).

Ein PI mit auffallend hohem Molekulargewicht von 820 000 ist das alpha-2-Makroglobulin, die Normalkonzentrationen liegen bei 300 mg% und bewirken etwa 10% der trypsinhemmenden Gesamtaktivität im menschlichen Serum. Es besitzt ein außergewöhnlich breites Wirkungsspektrum, das alle Klassen von Endopeptidosen, seien sie pflanzlichen, tierischen oder bakteriellen Ursprunges, umfaßt (27).

Das alpha-2-Makroglobulin weist einen einzigartigen Reaktionsmechanismus auf. Die Proteasen werden hier nicht durch chemische Interaktionen zwischen aktivem und reaktivem Zentrum gebunden, sondern durch eine Art Fallenmechanik gefangen. Diese Bindung ist irreversibel, die Proteasen können nur mit denaturierenden Agenzien wiedergewonnen werden (27). Es tritt keine vollständige Inaktivierung der Proteasen ein, diese behalten eine Restaktivität für Substrate bis zu einer bestimmten Größe. Die Komplexe werden in kurzer Zeit, d. h. um ein Vielfaches schneller als freies alpha-2-Makroglobulin oder Komplexe anderer PIs ausgeschieden. Offenbar bedingt die bei der Bindung eintretende sterische Änderung, daß das alpha-2-M Fremdproteincharakter annimmt. In der raschen Clearance scheint eine wichtige Funktion dieses Inhibitors zu liegen, zumal gezeigt werden konnte, daß er bereits durch andere PIs blockierte Proteasen von diesen übernimmt und aus dem Blut eliminiert (28/29).

Weiter scheint das alpha-2-M vor allem Bedeutung im fibrinolytischen System zu haben. Unter Streptokinastherapie, sowie bei postoperativ hämorrhagischen Zuständen zeigt es einen sehr raschen Abfall.

Plasmin wurde hierbei zum Überwiegenden Teil mit alpha-2-M im Komplex gefunden.

Der Inter-alpha-Trypsininhibitor (ITI) trägt seine Bezeichnung aufgrund seiner Lage zwischen alpha-1 und alpha-2 Globulinfraction in der Stärkeelektrophorese. Er kommt nur in einer Konzentration von etwa 45 mg/100 ml im menschlichen Serum vor und ist somit ein Spurenprotein. Von der antitryptischen Gesamtaktivität des Serums, die bis zu 2000 U/ml erreicht, entfällt nur etwa 1 % auf seine Wirkung. Sein Hemmspektrum erstreckt sich auf Trypsin, Chymotrypsin und Acrosin.

III. Spezieller Teil

1.) Die säurestabile Aktivität des menschlichen Serums und Urines

Bereits am Anfang dieses Jahrhunderts wurde die anti-proteolytische Aktivität zunächst in den starken eiweißhaltigen Urinen Kranker, später dann auch im Urin gesunder Probanden festgestellt.

Shulman und Astrupp (30/31) wiesen dann säurestabile Proteinasenaktivität in Serum und Urin nach. An teilgereinigten Inhibitoren fanden sie Molekulargewichte von 20 000 bis 70 000.

Proksch fand dann für den als Meningin bezeichneten Urininhibitor ein Molekulargewicht von 70 000 und entdeckte eine immunologische Verwandtschaft mit ITI (32).

1973 isolierte Hochstraßer aus menschlichem Serum und Urin mittels Affinitätschromatographie einen säurestabilen Inhibitor mit einem in der Gelchromatographie näherungsweise bestimmten Molekulargewicht von 22 000 (1).

Es war damit offensichtlich, daß in Abhängigkeit von der Art der Isolationsweise verschiedene säurestabile Inhibitoren erhalten werden.

2.) Der HI-30

Unter Anwendung konventioneller Methoden, d.h. ohne Affinitätschromatographie, und damit auszuschließender Veränderung während der Isolation, ist es gelungen, den physiologischen säurestabilen Inhibitor des Serums und Urins zu identifizieren.

In der Gelfiltration erscheint er in der Fraktion die einem Molekulargewicht von 65 000 entspricht. Aus der spezifischen Aktivität läßt sich ein theoretisches

Molekulargewicht von 30 000 errechnen, deshalb die Benennung HI-30 (Human Inhibitor M.W. 30 000). Die Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration des Trypsin-Inhibitorkomplexes ergibt einen Hinweis für eine 1 : 1 Komplexierung. Im Serum liegt der Inhibitor unkomplexiert vor und wird unverändert und frei im Urin ausgeschieden (1). Die Serumkonzentrationen liegen bei gesunden Personen bei 5-8 mIU/ml, im Urin zeigen sich Werte von 6-10 mIU/ml, die Tagesausscheidung liegt bei 4 000 - 14 000 mIU/Tag. Eine Korrelation zwischen der Höhe des Serumspiegels und der Tagesausscheidung besteht beim Gesunden nicht. Der HI-30 ist ein Glykoprotein mit einem relativ hohen Kohlehydrateanteil. Die in wässriger Lösung dadurch bedingte große Hydrathülle verursacht in der Gelfiltration eine höhere Wanderungsgeschwindigkeit und täuscht so ein größeres Molekulargewicht vor. In der Elektrophorese wird die Wanderungsgeschwindigkeit durch den Kohlehydratanteil erhöht, durch dessen Abspaltung mittels Neuraminidasebehandlung kann der HI-30 in eine langsam wandernde Form übergeführt werden (1). Der HI-30 ist der einzige Proteaseninhibitor der in messbarer Menge im Urin erscheint, das wird bedingt durch sein in Relation zu den anderen Serum-inhibitoren niederes Molekulargewicht, das die glomer. Filtrationsgrenze von 65 000 deutlich unterschreitet. Es wäre denkbar, daß der Kohlehydrateanteil, der eine hohe negative Ladung bedingt, bezüglich der renalen Ultrafiltrierbarkeit eine Rolle spielt. Durch seine Säurestabilität bleibt er auch bei niederen pH-Werten im Urin löslich und aktiv. Möglicherweise hat der HI-30 für das Nierenhohlssystem und die ableitenden Harnwege eine ähnliche Funktion wie die von manchen Drüsen, von den Schleimhäuten des Respirationstraktes und denen des Genitaltraktes sezernierten Inhibitoren.

3.) Der ITI als Prekursor des HI-30

1972 stellte Proksch eine immunologische Verwandschaft zwischen ITI und dem säurestabilen menschlichen Urin-inhibitor fest.

Hochstraßer zeigte dann, daß der HI-30 ein Produkt limitierten ITI-Abbaues ist (1/2). Durch Einwirkung von Trypsin im Überschuß auf ITI und HI-30 entsteht ein identisches Folgeprodukt. Bei vollständigem Verschwinden der Ausgangssubstanzen wird ein Inhibitor mit einem Molekulargewicht 14 000 freigelegt, der eine dem HI-30 sehr ähnliche Hemmwirkung zeigt.

Die qualitative in vitro Darstellung von HI-30 gelang dann durch die Inkubation von ITI mit Pankreaskallicrein (2).

Beim lebenden Organismus zeigt sich dieses Hervorgehen des säurestabilen Inhibitors aus seinem Prekursor am deutlichsten bei der Untersuchung von Seren von Patienten mit Sepsis (4). Hier findet ein Parallelanstieg von HI-30 und eines gleichzeitig entstehenden säurelabilen ITI-Spaltproduktes statt. Der Proinhibitorverbrauch kann hier, im Gegensatz zu mehr protrahiert verlaufenden Krankheitsbildern, nicht durch eine erhöhte Syntheserate kompensiert werden und bewirkt einen deutlichen Abfall der ITI-Konzentration.

4.) Die Einzigartigkeit des ITI- HI-30-Systemes

Lange waren es nur zwei Gruppen von Proteasen, in die man die bei höheren Lebewesen vorkommenden Proteasen einteilen konnte. Die Inhibitoren des Serums, gekennzeichnet durch ein hohes Molekulargewicht und Instabilität gegen Säuren. Sie erscheinen nur in geringer Konzentration in der interstitiellen Flüssigkeit und den Sekreten.

Die Inhibitoren der exkretorischen Drüsen und der Schleimhäute, die in größeren Mengen in den Sekreten erscheinen (Pankreassaft, Bronchialschleim, Cervikalsekret). Sie zeigen durchweg ein niedriges Molekulargewicht, eine gute Gewebegängigkeit und sind säurestabil.

Mit dem ITI- HI-30-System wurde ein Vertreter einer neuen dritten Inhibitorgruppe gefunden. Aus dem ITI, der durch all seine Eigenschaften als der ersten Gruppe zugehörig anzusehen ist, geht durch Abspaltung ein Inhibitor hervor, der seinem Wesen nach voll der Gruppe Zwei zuzurechnen ist. Der HI-30 ist der erste Proteaseninhibitor, der nicht am Ort seiner Wirkung synthetisiert und sezerniert wird, sondern ähnlich einigen Hormonen und Enzymen aus einer Vorstufe hervorgeht (1,2,4).

5.) Künstliche vom ITI abgeleitete säurestabile Inhibitoren

Wie bereits erwähnt, wird durch Einwirkung von Trypsin im Überschuß aus ITI oder dem davon abstammenden HI-30 ein säurestabiler Trypsininhibitor mit dem Molekulargewicht 14 000 freigelegt.

Der HI-14 (Human-Inhibitor Mg 14 000) entsteht bereits nach kurzer Zeit (6), nach prolongierter Inkubation wird ein ebenfalls säurestabiler Inhibitor mit dem Molekulargewicht 8 000 gefunden (= HI-8).

HI-14 und HI-8 bilden ebenso wie ITI und HI-30 mit Trypsin äquimolare Komplexe. Es ist naheliegend anzunehmen, daß von ITI-, bzw. HI-30-, bzw. HI-14-Trypsinkomplexen von im Überschuß vorliegendem Trypsin schrittweise für die Hemmwirkung nicht erforderliche Molekülteile abgespalten werden, es verbleibt schließlich der im Reaktionsansatz nicht weiter spaltbare "Minimalinhibitor", der HI-2.

Dieser Prozeß läuft auch bei der Isolation von HI-30 mittels Affinitätschromatographie an der Trypsin-Sepharose ab. Die Erstuntersucher haben somit vermutlich Gemische aus nativem HI-30 und seinen Abbauprodukten erhalten, damit sind die anfangs gefundenen stark unterschiedlichen Molekulargewichte zu erklären.

Weder HI-14 noch HI-8 konnten in vivo nachgewiesen werden. Es sind also nur in vitro herstellbare Spaltprodukte. Wie aus ihrer Darstellung abgeleitet werden kann, repräsentieren sie jedoch den antitryptischen Molekülort des ITI und damit auch des HI-30.

Hochstraßer ist es vor kurzem gelungen, die Primärstruktur des HI-8 und des HI-14 vollständig aufzuklären. Überraschend zeigte sich eine ausgeprägte Homologie zu den Inhibitoren vom Kunitz-Typ. Dies ist eine Gruppe einander sehr ähnlicher Inhibitoren, ihr bekanntester Repräsentant ist der erste vollständig sequenzierte Proteaseninhibitor BPTI (Bovine basic pancreatic trypsin inhibitor).

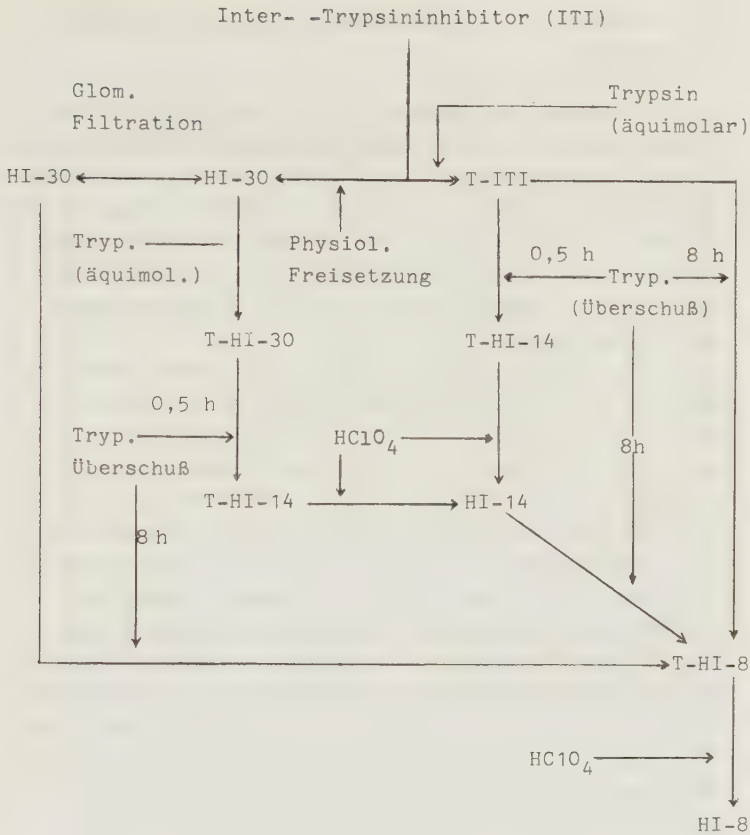
Der Vergleich der reaktiven Zentren und der daran unmittelbar angrenzenden Peptidbereiche zeigt, daß die Position P1 durch zwei verschiedene jedoch einander sehr ähnliche jeweils basische Aminosäuren besetzt ist, im HI-8 vertritt Arginin das Lysin, das im BTPI diese Position besetzt. Im Übrigen besteht völlige Übereinstimmung (3,6).

Der ITI, dessen antitryptisch aktive Domäne der HI-8 ist, kann somit als der erste großmolekulare Kunitztyp-Inhibitor angesehen werden.

Der HI-14 besteht aus zwei miteinander kovalent verbundenen Domänen. Die erste Domäne wird vom HI-8 gebildet, die zweite Domäne zeigt ebenfalls eine ausgeprägte Homologie zu Kunitz-Typ-Inhibitoren, hat jedoch keine antitryptische Aktivität. Im Bereich des reaktiven Zentrums ist hier die Position der basischen Aminosäure, P1, mit Methionin besetzt.

Analoge Aminosäurenplazierungen finden sich bei den Inhibitoren vom Kazal-Typ. Beim Submandibularinhibitor des Hundes wird diese Position ebenfalls von Methionin besetzt, in einer Domäne des Truthahneinhibitors wird P 1 von Leucin besetzt (35,36). Während bei diesen beiden Beispielen eine Proteasenhemmwirkung besteht, konnte eine solche bei der zweiten Domäne des HI-14 bisher nicht nachgewiesen werden.

Ob die inaktive Domäne möglicherweise inhibitorische Wirkung gegen derzeit noch unbekannte Proteinasen besitzt, wird diskutiert.



Verwandtschaft zwischen dem ITI und seinen physiologischen und künstlichen Abkömmlingen. (6)

ITI = Inter-alpha-Trypsinh.

T-ITI = Trypsin Komplex

HI-30 = Physiol. abgeleiteter Inh.

T-HI-30 = Trypsin Komplex

HI-14 = Trypt. freiges. Inh. MG 14 000

T-HI-14 = Trypsin Komplex

HI-8 = Trypt. freiges. Inh. MG 8 000

T-HI-8 = Trypsin Komplex

6.) Veränderungen im ITI- HI-30-System bei verschiedenen Erkrankungen

Der ITI-Spiegel im Serum und die HI-30-Konzentration in Serum und Urin, sowie die HI-30 Tagesausscheidungs- menge bewegen sich beim Gesunden in engen Grenzen. Ein säure- labiles Derivat (= D 1), das bei der Abspaltung von HI- 30 aus ITI entsteht und durch Kreuzreaktion mit gegen ITI gerichteten Antikörpern nachgewiesen werden kann, findet sich in Serum Gesunder in nur wenig schwanken- der Konzentration (4).

Bei einigen Erkrankungen zeigen diese Größen deutliche Abweichungen von ihren Normalwerten.

Bei verschiedenen Nierenerkrankungen zeigt sich eine Konzentrationserhöhung von ITI und seinem säurelabilen und säurestabilen Derivat. Im Stadium der kompensierten Retention der Niereninsuffizienz steigen die HI-30-Werte im Serum proportional zum Serumkreatinin bis zum 30- fachen der Norm. Abstoßungskrisen nach Nierentrans- plantationen können durch HI-30-Bestimmungen früher als durch den Kreatininwert vorausgesehen werden (33/34). Der höchste ITI- und HI-30-Anstieg wurde bei Urämie ge- funden. Bei allen untersuchten Nephropathien zeigt das Ansteigen des nicht renal filtrierbaren säurelabilen Derivates, daß hier nicht nur eine eingeschränkte glo- meruläre Filtration, sondern auch ein erheblich ge- steigerter Umsatz vorliegt (4).

Eine erhebliche Steigerung der Spaltungsrate des Pre- kursors liegt auch bei Septikämie vor, darauf weist ne- ben einer Zunahme der D 1-Konzentration ein Abfall des ITI hin.

Bei einigen entzündlichen Erkrankungen wie Bronchitis, Pneumonie, Endokarditis und Cholangitis, sowie bei ge- ringgradigen Verbrennungen zeigten erhöhte D 1-Werte bei nicht signifikant verändertem ITI und HI-30 mäßig be- schleunigten Umsatz an (5).

7.) ITI-spaltende Proteasen

Mit dem Wissen um das Hervorgehen des säurestabilen Serum-inhibitors aus dem ITI stellt sich die Frage, welche Protease physiologischerweise diese limitierte Proteolyse bewirkt.

Wie bereits erwähnt gelang es zunächst durch Trypsin-einwirkung säurestabile Inhibitoraktivität aus ITI freizulegen (1). Dabei entsteht jedoch ausschließlich der in vivo nicht vorkommende HI-14. Da Trypsin sowohl vom Prekursor als auch vom Folgeprodukt stark gehemmt wird, gelingt die Freisetzung nur bei Inkubation mit im lebenden Organismus nicht zu erwartendem Trypsinüberschuß.

Mit Pankreaskallikrein schien dann zunächst ein mögliches natürliches Liberating Enzym gefunden (2). Qualitative Untersuchungen zeigten, daß es aus ITI HI-30 freisetzt. Aufgrund der hohen Substratspezifität des Kallikreins lag die Annahme einer nur zufälligen Wirkung fern. Spätere quantitative Untersuchungen machten jedoch deutlich, daß die Spaltungsrate des Kallikreins erheblich zu gering ist, um bei dessen niedrigen physiologischen Konzentrationen die immenschlichen Serum gefundenen Mengen an HI-30 zu bewirken(9). Ähnliche Verhältnisse zeigen sich auch beim Plasmin. Es ist in der Lage, die Abspaltung eines säurestabilen Inhibitors zu katalysieren. Die Spaltungsrate ist jedoch nur geringfügig höher, als die des Kallikreins, die Bedeutung für die uns interessierende Reaktion ist damit sicher zu vernachlässigen (9).

Einen sehr hohen ITI-Turnover bewirkt Granulozytenelastase, die pro Zeiteinheit dadurch freigesetzte säurestabile Inhibitoraktivität übersteigt die durch gleiche Trypsinmenge bewirkte bei weitem. Eine starke Hemmung durch

Prekursor oder HI-30 besteht nicht (9). Es scheint möglich, daß kleine Mengen freigesetzter Granulozytenelastase eine ITI-Degradation bewirken, bevor sie durch andere Plasmainhibitoren neutralisiert werden. Daß mit der Granulozytenelastase das physiologische Liberatingenzym gefunden wurde ist sehr wahrscheinlich. Dies wird bekräftigt durch die Befunde entzündlicher Erkrankungen, die entsprechend der dabei stattfindenden erhöhten Leukozytendegranulation, die demgemäß zu erwartenden Anstiege der HI-30-Spiegel zeigen.

8.) Zielsetzung der eigenen Untersuchungen am Serum des Schweines

Die Ergebnisse über die säurestabile Aktivität des menschlichen Serums sind in vieler Weise überraschend. Es ist von Interesse, welche Parallelen und Unterschiede hier zu biologisch artverwandten Spezies bestehen.

Am Serum des Schweines wird untersucht, ob sich hier ein System säurestabiler antitryptischer Aktivität findet; inwieweit sich -in Analogie zum Menschen- durch Trypsin aus dem Niederschlag säuregefällten Serums neue antitryptische Aktivität freilegen läßt. Die Untersuchung darzustellenden säurestabilen Inhibitors des Schweineserums soll zeigen, ob das zweite, beim Menschen inaktive Domain, eine Wirkung auf eine der bekannten Proteasen hat. Vergleiche von Aminosäuresequenz, Aminosäurezusammensetzung und Molekulargewicht sollten Analogien aufzeigen.

IV. Ergebnisse

1.) Der natürliche säurestabile Trypsininhibitor im Schweineserum.

Wie im menschlichen Serum findet sich nach Enteiweißung von Schweineserum mit Perchlorsäure im Überstand antitryptische Aktivität. Diese beträgt im Schweinemischserum 5,9 mIU/ml. Bei der Gelfiltration auf Sephadex G-75 erscheint der Inhibitor aus Schweineserum im gleichen Elutionsvolumen wie der säurestabile Inhibitor des menschlichen Serums HI-30. Deshalb wurde dieser Hemmstoff als PI-30 (Pig Inhibitor MW 30 000) bezeichnet (Abb.: 1 a, 1 b).

2.) Enzymatisch freilegbare säurestabile Inhibitoren als Nachweis eines ITI-analogen Proteins im Serum des Schweines.

Beim Menschen ist der Inter-alpha-Trypsininhibitor Proinhibitor des säurestabilen Serum- und Urininhibitors, sowie künstlicher kleinmolekularer Inhibitoren. Aus dem ITI und ebenso aus dem Niederschlag säuregefällten menschlichen Serums kann durch Einwirkung von Trypsin im Überschuß ein Hemmstoff mit dem MG 14 000 freigelegt werden, von dem durch prolongierte Trypsineinwirkung ein Inhibitor mit dem MG 8 000 abgespalten werden kann.

Bei den Untersuchungen am Serum des Schweines konnte indirekt ein dem menschlichen ITI entsprechendes Protein nachgewiesen werden. Es wurde der wiedergelöste Niederschlag säuregefällten Serums mit Trypsin im Überschuß inkubiert, nach erneuter Fällung der säurelabilen Proteine mit HClO_4 konnte im Überstand neu entstandene säurestabile antitryptische Aktivität nachgewiesen werden.

Bei diesem Vorgehen konnten aus dem Niederschlag von 1 ml Serum 9,8 mIU Inhibitoraktivität freigelegt werden. Diese Menge ist niedriger als beim Menschen, wo bei gleichem Vorgehen 50 mIU/ml säurestabiler Inhibitor gewonnen werden können. Die Ausbeute ist limitiert, sie kann durch Verlängerung der Inkubationszeit über ein notwendiges Maß hinaus nicht erhöht werden.

Bei der Gelchromatographie auf Sephadex G-75 zeigt sich, daß zwei kleinmolekulare Inhibitoren entstanden sind. Die zugehörigen Aktivitätsgipfel finden sich jeweils in den gleichen Elutionsfraktionen wie die säurestabilen Inhibitoren menschlicher Herkunft mit dem MG 8 000 und dem MG 14 000 (Abb.: 1 c, 1 d). Es erfolgte deshalb die Bezeichnung PI-14 (Pig Inhibitor MG 14 000) und PI-8 (Pig Inhibitor MG 8 000). Bei kurzzeitiger Inkubation entsteht fast ausschließlich PI-14, bei langzeitiger Einwirkung zum Überwiegenden Teil PI-8. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, daß im Serum des Schweines ein dem menschlichen ITI analoges säurelabiles Protein vorhanden ist. Dieses setzt offenbar durch Einwirkung von Trypsin im Überschuß zunächst den PI-14 frei, von dem bei prolongierter Inkubation noch ein weiterer Molekülanteil abgespalten werden kann, so daß der PI-8 entsteht. Dieser schließlich verbleibende, gegen weiteren Abbau stabile, Minimalinhibitor ist als der Molekülort der antitryptischen Aktivität des P-ITI anzusehen.

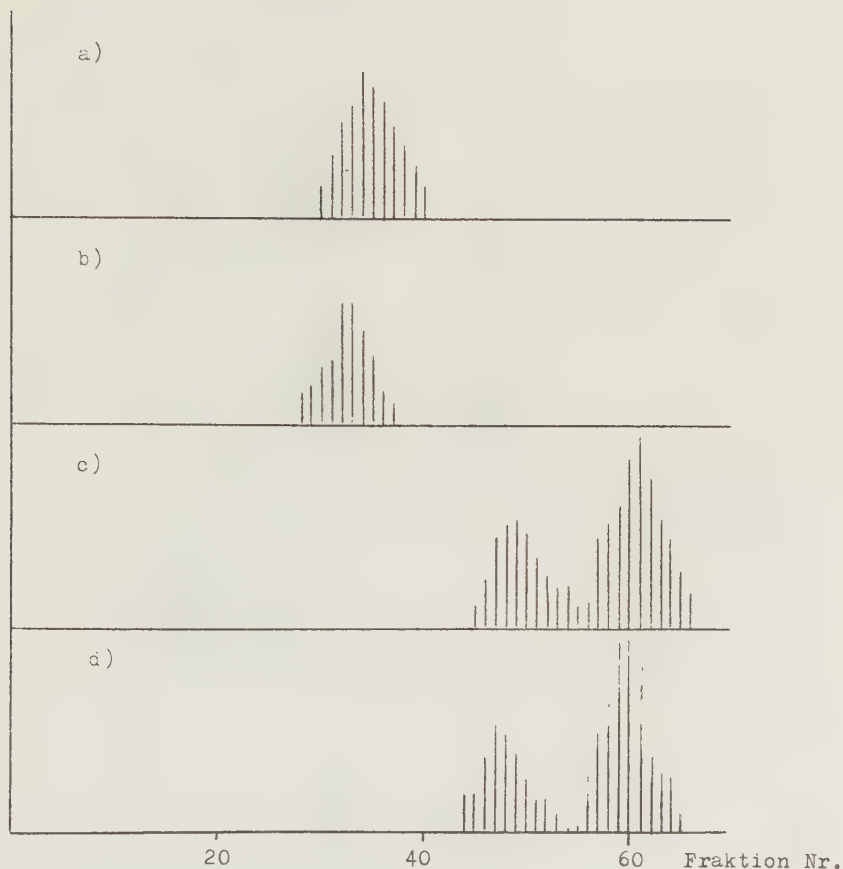


Abb.: 1. Gelchromatographie von säurestabilem Inhibitor aus menschlichem und Schweineserum im Vergleich. Sephadex G-75 Säule 3 x 200 cm, Elution mit 0,05 M Borat, 0,2 M NaCl Puffer pH 8. Inhibitornachweis erfolgte mit dem Trypsinhemmtest.

a) Nativer HI-30. b) Nativer PI-30. c) H-ITI nach langer Inkubation mit Trypsin im Überschuß. d) Inhibitor aus säuregefälltem und wiedergelöstem Schweineserum nach langzeitiger Inkubation mit Trypsin im Überschuß.

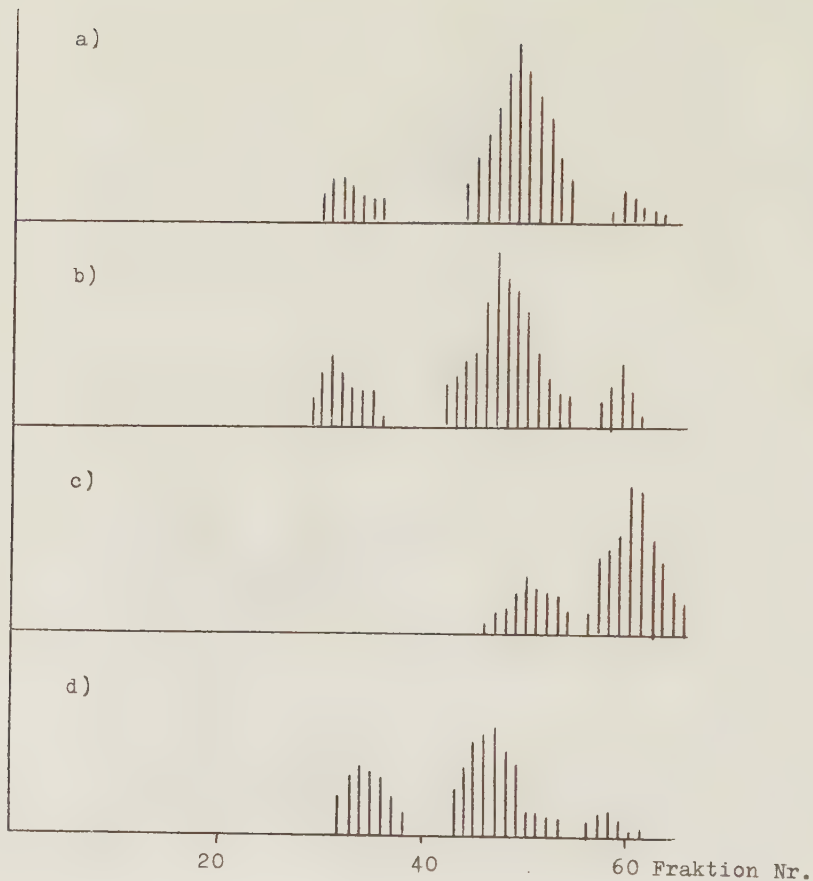


Abb.: 2. Gelchromatographie von säurestabilem Inhibitor aus Menschen- und Schweineserum im Vergleich.

Sephadex G-75 Säule 3 x 200 cm, Elution mit 0,05 M Borat 0,2 M NaCl Puffer pH 8. Inhibitornachweis erfolgte mit dem Trypsinhemmttest.

- a) HI-30 nach kurzer Inkubation mit Trypsin im Überschuß.
- b) PI-30 nach kurzer Inkubation mit Trypsin im Überschuß.
- c) PI-30 nach langer Inkubation mit Trypsin im Überschuß.
- d) PI-30 nach Affinitätschromatographie an Trypsin-Sepharose.

3.) Der P-ITI als Proinhibitor des PI-30

Der native säurestabile Inhibitor des Schweineserums ist empfindlich gegen Trypsineinwirkung. Wird er mit Trypsin im Überschuß inkubiert, werden für die Hemmwirkung nicht erforderliche Molekülteile abgespalten. Nach Entfernung des zugesetzten Trypsins durch Perchlorsäurefällung finden sich bei der Gelchromatographie die als P-ITI-Abkömmlinge bereits bekannten Inhibitoren PI-14 und PI-8. Wobei bei kurzer Inkubation wiederum überwiegend PI-14 und nach langer Inkubation überwiegend PI-8 entsteht (Abb.: 2 b, 2 c).

PI-30 findet sich nach kurzer Einwirkung von Trypsin im Überschuß nur noch in Spuren, nach langer Einwirkung ist es im Reaktionsansatz nicht mehr nachzuweisen. Diese Abbaureaktion findet auch an trägerharzgebundenem Trypsin statt. Wird versucht PI-30 mittels Affinitätschromatographie zu isolieren, findet sich im Eluat ein Gemisch von PI-14 und PI-8 neben unverändertem PI-30 (Abb.: 2 d).

Die Entstehung von identischen Folgeprodukten aus PI-30 und aus P-ITI beweist, daß der PI-30 nicht als solcher vom Organismus synthetisiert wird, sondern bereits Folgeprodukt ist. Es ist anzunehmen, daß er in vivo durch einen noch nicht bekannten physiologischen Prozeß vom P-ITI abgespalten wird.

Die Verwandtschaft zwischen dem P-ITI und seinen natürlichen und künstlichen Abkömmlingen zeigt Abbildung 3. Es besteht hier völlige Übereinstimmung mit den Verhältnissen beim Menschen.

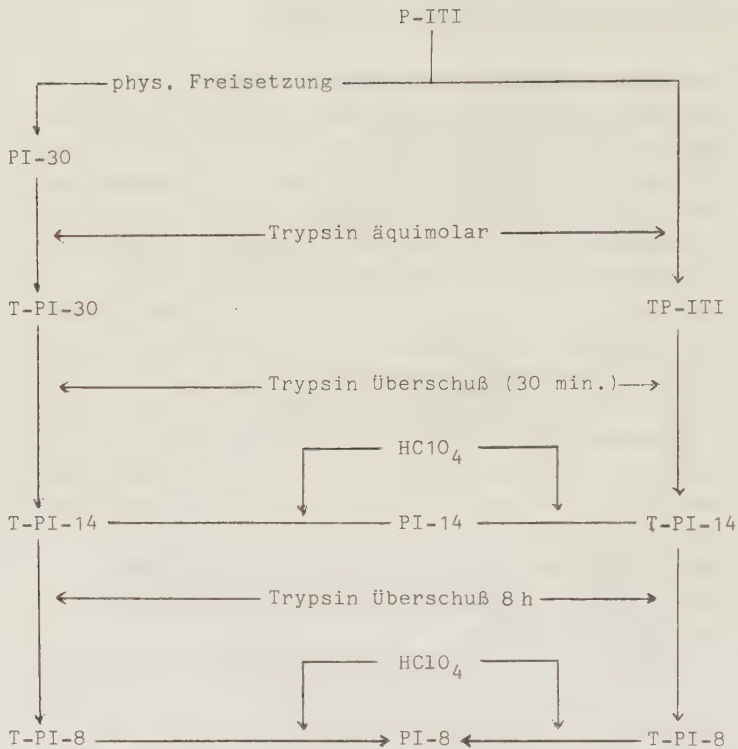


Abb.: 3. Verwandtschaft zwischen P-ITI und seinen physiologischen und künstlichen Abkömmlingen.

P-ITI = Pig Inter-alpha-Trypsin Inh.	TP-ITI = Trypsinkomplex
PI-30 = Physiol. Seruminhibitor	T-PI-30 = Trypsinkomplex
PI-14 = Trypt. freiges. Inh. MW 14 000	T-PI-14 = Trypsinkomplex
PI-8 = Trypt. freiges. Inh. MW 8 000	T-PI-8 = Trypsinkomplex

4.) Aminosäurenzusammensetzung und teilweise Primärstruktur des PI-14

Der reindargestellte PI-14 wurde der Aminosäurenanalyse unterworfen. Der Vergleich mit der bekannten Aminosäurenzusammensetzung von menschlichem und bovinem Inhibitor (Abb.:4) zeigt eine sehr weitgehende Übereinstimmung der Zahl der einzelnen am Molekulaufbau beteiligten Aminosäuren.

Jeweils von einem tryptischen Peptid des ersten und des zweiten Domains konnte die Aminosäuresequenz ermittelt werden. Vergleicht man diese mit der des HI-14 findet man nur geringe Unterschiede in der Primärstruktur der einander entsprechenden Molekülabschnitte. Von den 23 beim PI-14 bestimmten Positionen sind 18 mit der gleichen Aminosäure wie beim Menschen besetzt, bei den übrigen 5 finden sich Ersatzbesetzungen durch einander jeweils nahe verwandte Aminosäuren. Große Ähnlichkeit besteht auch zu analogen Molekülbereichen des Kunitz-Typ-Rindergebeinshinhibitors (Abb.:5).

	HI-14	BI-14	PI-14
Asparagin	11	11	13
Threonin	6	4	4
Serin	5	6	10
Glutaminsäure	14	14	16
Prolin	5	4	6
Glycin	17	15	17
Alanin	7	7	7
Valin	6	4	5
Methionin	4	2	3
Isoleucin	2	3	3
Leucin	7	10	7
Tyrosin	7	7	7
Phe	7	8	7
Histidin	0	0	1
Lysin	6	9	6
Arginin	5	5	3
Tryptophan	1	1	?

Abb.: 4. Aminosäurezusammensetzung des tryptisch freilegbaren säurestabilen Inhibitors aus Menschen-, Rinder- und Schweineserum im Vergleich.

BPTI	Arg-Pro-Asp-Phe-Cys-Leu-Glu-Pro-Pro-Tyr-...
HI-14 D I	Lys-Glu-Asp-Ser-Cys-Gln-Leu-Gly-Tyr-Ser-...
HI-14 D II	Thr-Val-Ala-Ala-Cys-Asn-Leu-Pro-Val-Ile-...
PI-14 D I	Lys-Glu-Asp-Ser-Cys-Gln-Leu-Gly-Tyr- ⁺)
BPTI	...-Thr-Phe-Val-Tyr-Gly-Gly-Cys-Arg-Ala-
HI-14 D I	...-Thr-Phe-Gln-Tyr-Gly-Gly-Cys-Met-Gly-
HI-14 D II	...-Leu-Phe-Pro-Tyr-Gly-Gly-Cys-Gln-Gly-
PI-14 D II	⁺)-His-Phe-Ser-Tyr-Gly-Gly-Cys-Glu-Gly-
BPTI	-Lys-Arg-Asn-Asn-Phe-...
HI-14 D I	-Asn-Gly-Asn-Asn-Phe-...
HI-14 D II	-Asn-Gly-Asn-Lys-Phe-...
PI-14 D II	-Asn-Gly-Asp-Lys-Phe- ⁺)

Abb.: 5. Vergleich der Aminosäuresequenz von Teilstücken des 1. Domains und des 2. Domains des aus Schweineserum-inhibitor freigelegten PI-14 mit den analogen Molekülbe-reichen des vom menschlichen ITI abgeleiteten Inhibitors HI-14 und dem Kunitz-Typ-Rindergewebe-Inhibitor (BPTI= bovine basic pancreatic inhibitor).

⁺) = Weiterer Verlauf noch nicht sequenziert.

5.) Identifizierung des PI-14 als doppelköpfigen Trypsin-Elastase-Inhibitor

Auf der Suche nach dem Zielenzym des I. Domains -dem beim Menschen als inaktiv bezeichneten- wurde die Hemmwirkung des PI-14 auf verschiedene Enzyme untersucht.

Dabei zeigte sich neben der bekannten Wirkung auf Trypsin und Chymotrypsin eine starke Inhibition von Elastasen aus polymorphkernigen Leukozyten und aus Pankreas. Beim PI-8, der dem C-terminalen Domain II des aus zwei Domänen aufgebauten PI-14 entspricht, ist keinerlei Aktivität gegen Elastase nachzuweisen. Daraus ist abzuleiten, daß das aktive Zentrum für Elastase im anderen, dem N-terminalen Domain des PI-14 lokalisiert ist.

Dieses Domain kann als kleinmolekularer Inhibitor mit erhaltener Antielastasewirkung isoliert werden. Dazu wird der PI-14 der prolongierten Einwirkung von Trypsin im Überschuß ausgesetzt und dabei der PI-8 abgespalten. Wird dieser Ansatz nach Deproteinisierung und Neutralisation über eine Säule sepharosegebundene Trypsins gefiltert, wird der entstandene PI-8 und der eventuell noch in Spuren vorhandene PI-14 quantitativ gebunden. Das Filtrat zeigt erwartungsgemäß keine Aktivität gegen Trypsin, jedoch ausgeprägte Hemmwirkung gegen Elastase. Das Filtrat wird der Gelfiltration auf der Sephadex G-75-Säule unterworfen, hier erscheint der Elastaseinhibitor im gleichen Elutionsvolumen wie der PI-8. Es erfolgte deshalb die Bezeichnung PI-8-E (Pig Inhibitor MW 8 000 Elastase).

Im intakten PI-14 zeigen die beiden Domäne eine voneinander unabhängige Interaktion mit ihren jeweiligen Zielenzymen. Die Titration von Elastase mit PI-8-E, PI-14 und Trypsinbeladenem PI-14 (=T-PI-14) zeigt identische Kurvenverläufe (Abb.: 6).

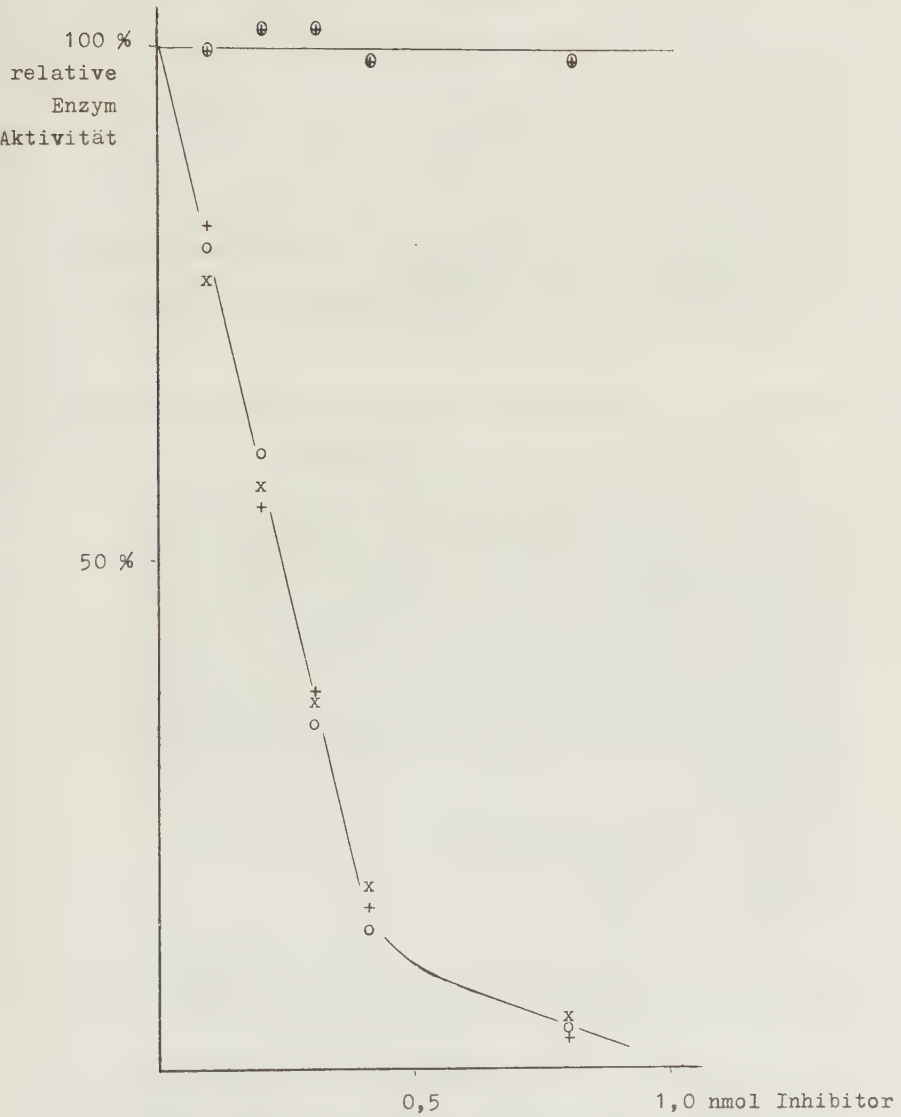


Abb.: 6. Titration von Pankreaselastase durch:

○ PI-14 = Pig Inhibitor Domaine I - II

+ PI-8-E = Pig Inhibitor Domaine I

x T-PI-14 = Pig Inhibitor Domaine I - II Trypsinkomplex

⊗ PI-8-T = Pig Inhibitor Domaine II

V. Material und Methoden

1.) Material

Trypsin mit chloro(N-p-toluolsulfonyl-L-phenylanyl)methane (TPCK) behandelt / Merk Darmstadt.

Frisches Schweineblut von Südfleisch GmbH, Pfarrkirchen.

2.) Isolation von nativem säurestabilem Schweineseruminhibitor

55 l Schweineblut werden sofort nach der Gewinnung mit 5,5 l 3,8-%iger Natriumcitratlösung versetzt. Nach Abtrennung der Erythrozyten werden dem Plasma 7 Vol.% 70-%ige Perchlorsäure zugesetzt. Der Niederschlag der säurelabilen Serumproteine wird durch Zentrifugation abgetrennt und zur späteren Weiterverwendung aufbewahrt. Aus dem Überstand werden Proben entnommen und der Inhibitorgehalt mit dem Trypsinhemmtest bestimmt. Es ergibt sich ein Wert 5,1 mU/ml Überstand, was unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors 5,9 mU/ml Serum entspricht.

Probe I	4,9 mU/ml	Überstand
Probe II	5,1 mU/ml	
Probe III	5,1 mU/ml	

Liste der Ableitungen der in 3 Portionen erfolgenden Aufarbeitung.

Der Überstand wird nun mit KOH-Lösung neutralisiert und vom dabei entstehenden Kaliumperchloratniederschlag dekantiert. Nach Entsalzung auf der Biogelsäule p-2 und

weiterer Entsalzung und Einengung durch Druckdialyse erfolgt die näherungsweise Molekulargewichtsbestimmung auf einer Sephadexsäule G-75 (3x200 cm), eluiert wird mit einem 0,05 M Borat -0,2 M NaCl -pH 8 Puffer. Im Eluat wird der Inhibitor mit dem Trypsinhemmtest identifiziert. Der Maximalwert der Inhibitoraktivität findet sich in der Fraktion, die einem Molekulargewicht von 30 000 entspricht (Abb.: 1 a, 1 b).

3.) Freilegung von säurestabilem Trypsininhibitor aus perchlorsäuregefälltem Schweineserum.

Der Niederschlag der Serumproteine aus 10 l perchlorsäuregefälltem Schweineserum wird mit destilliertem Wasser wieder aufgeschlämmt und mit konzentrierter NaOH-Lösung auf pH 8 eingestellt. Es wird TPCK-behandeltes Trypsin im Überschuß zugesetzt und im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Vor Zusatz von Trypsin und nach 10, 20, 30 Minuten und 8 Stunden nach Trypsinzusatz werden Proben zu 2 ml entnommen. Diese werden mit 0,2 ml 70-%iger Perchlorsäure deproteinisiert und dann zentrifugiert. Der Überstand wird mit 5 N NaOH neutralisiert und dann die Hemmaktivität mit dem Trypsinhemmtest ermittelt.

vor Trypsinzusatz	0	mIU/ml
10 Min. nach Trypsinzusatz	9,6	mIU/ml
20 Min. nach Trypsinzusatz	10,2	mIU/ml
30 Min. nach Trypsinzusatz	9,6	mIU/ml
8 Std. nach Trypsinzusatz	9,3	mIU/ml

Liste 2: Neue mit Trypsin aus perchlorsäuregefälltem Schweineserum freigelegte Inhibitoraktivität.

Nach 8 Stunden wird die Reaktion durch Zusatz von Perchlorsäure unterbrochen, die säurelabilen Proteine

gefällt und dabei auch der neu entstandene Inhibitor aus seinem Komplex mit Trypsin entlassen.

Nach Zentrifugation und Verwerfen des Niederschlages wird mit KOH auf einen Wert von pH 6 titriert. Der Überstand wird vom Kaliumperchloratniederschlag dekantiert und durch Vakuumverdampfung auf ein Drittel des Volumens eingeeengt. Weitere Entsalzung geschieht über eine Biogelsäule p 2 (5x30 cm). Eluiert wird mit dest. Wasser, Inhibitor nachweis im Eluat erfolgt mit dem Trypsinhemmtest, Chloridionen werden mit Silbernitrat nachgewiesen.

Nach Einstellung des pH-Wertes mit NaOH auf einen Wert von 7,8 wird sepharosegebundenes Trypsin zugesetzt. Die Suspension wird gewaschen durch Aufschwemmen mit Borat- und NaCl-Puffer pH 8 im Wechsel und jeweils anschließender Unterdruckfiltration bis nahezu zur Trockenheit. Die Elution erfolgt mit 0,2 N KCl-1,5 N HCl-Puffer pH 1,5. Die Suspension wird gefiltert, das Filtrat neutralisiert und mittels Ultrafiltration eingeeengt. Die Inhibitorlösung wird nun der Gelfiltration unterworfen. Zum Einsatz kommt eine Sephadex-G-75-Säule (3x200 cm), eluiert wird mit 0,05 M Borat - 0,2 M NaCl - pH 8 - Puffer. Das Eluat wird mit 200 Tropfen pro Reagenzglas fraktioniert. Die inhibitorenthaltenden Fraktionen werden mit dem Trypsinhemmtest identifiziert. Die Inhibitoraktivität erscheint im Eluat in zwei Gipfeln, was bedeutet, daß zwei Inhibitoren neu entstanden sind. Die Lage der zugehörigen Maxima zeigt, daß ein Inhibitor mit dem MG 14 000 und ein solcher mit dem MG 8 000 entstanden ist. Der Anteil an Inhibitor mit dem MG 8 000 beträgt dabei etwa 70 %, der an Inhibitor mit dem MG 14 000 30 % (Abb.: 1c).

Mit einem zweiten Ansatz wird das oben beschriebene Vorgehen wiederholt. Die Inkubationszeit mit Trypsin im Überschuß wird dabei auf 30 Min. verkürzt. Bei der Gelfiltration finden sich dabei wiederum die gleichen Inhibitoren, jedoch mit anderem Mengenverhältnis.

Überwiegend entsteht hierbei der Inhibitor mit dem MG 14 000, der Inhibitor mit dem MG 8 000 erscheint nur in geringer Menge.

4.) Tryptische Abbauprodukte des nativen säurestabilen Inhibitors des Schweineserums.

100 IU-Nativer Schweineseruminhibitor, gewonnen aus dem Überstand von perchlorsäuregefälltem Serum, wird nach Neutralisation, Entsalzung und Einengung durch Vakuumverdampfung in 0,2 M Triäthanolamino/HCl-Puffer pH 7,8 gelöst und mit Trypsin (0,13 g) im Überschuß 30 Min. inkubiert. Die Reaktion wird durch Zusatz von HClO_4 gestoppt und zur vollständigen Inaktivierung des Trypsins 24 Stunden stehen gelassen. Der Überstand wird vom ausfallenden Trypsin getrennt, mit 4 N KOH neutralisiert und vom KClO_4 -Niederschlag dekantiert. Der Überstand wird mit 2 N NaOH auf pH 7,8 eingestellt und eine ausreichende Menge an sepharosegebundenem Trypsin zugesetzt. Nach Filterung und mehrfacher Waschung mit 0,2 M Triäthanolamino/HCl, 0,2 M NaCl-Puffer pH 8, wird gebundener Inhibitor freigesetzt, durch Suspension in 500 ml 0,2 M KCl-Lösung bei Einstellung des pH-Wertes auf 1,5 durch Zugabe von 1,5 N HCl. Die Suspension wird gefiltert, das Filtrat neutralisiert und durch Ultrafiltration eingeengt. Die Bestimmung der antitryptischen Aktivität ergibt einen Wert von 70 U.

Die Lösung wird der Gelfiltration auf Sephadex G-75, 3x200 cm-Säule, unterworfen. Elution erfolgt mit 0,5 M Borat, 0,2 M NaCl-Puffer pH 8,0. Fraktioniert wird mit 40 Tropfen pro Reagenzglas. Antitryptische Aktivität im Eluat wird mit dem Trypsinhemmtest festgestellt, diese erscheint in zwei Gipfeln.

Zum überwiegenden Teil erscheint ein Inhibitor mit dem Molekulargewicht 14 000, zu einem sehr geringen Anteil ein solcher mit dem MG 8 000 (Abb.: 2 a). Bei einem zweiten Ansatz wird das obige Vorgehen unter Verlängerung der Inkubationsdauer von PI-30 mit Trypsin im Überschuß auf 8 Stunden wiederholt. Bei der Gelfiltration erscheinen wieder die beiden Inhibitoren PI-14 und PI-8, es überwiegt jetzt jedoch der Anteil an PI-8 (Abb.: 2 c).

5.) Darstellung von PI-14 und Präparation der Peptide.

Zur Sequenzanalyse werden große Mengen von PI-14 benötigt. Dazu wird aus 165 l Schweineblut der nativ im Serum vorhandene PI-30 präpariert. Es werden etwa 400 IU Inhibitor gewonnen. Dieser wird in 200 ml 0,2 M Triäthanolamino/HCl-Puffer, pH 7,8 gelöst, dem Ansatz TPCK-behandelten Trypsins in 0,1 M Überschuß zugesetzt und 30 Min. bei 37°C inkubiert. Dabei entsteht ein PI-30-Trypsinkomplex, der durch im Überschuß vorliegendes Trypsin in einen PI-14-Trypsinkomplex übergeführt wird. Die Reaktion wird gestoppt durch Zusatz von HClO_4 , dabei wird Trypsin denaturiert und PI-14 freigesetzt. Nach Zentrifugierung wird der Überstand mit KOH neutralisiert und vom ausfallenden Kaliumperchlorat dekantiert. Die antitryptische Aktivität wird durch Affinitätschromatographie mittels sepharosegebundenem Trypsin isoliert. Durch Filtration auf der Sephadex-G-75 (3x200 cm)-Säule werden geringe Mengen von PI-30 und Spuren von entstandenem PI-8 abgetrennt. Die PI-14-enthaltenden Fraktionen werden vereinigt, durch Ultrafiltration entsalzt und dann gefriergetrocknet. Es werden 220 mg PI-14 gewonnen. Der Inhibitor wird dann durch Reduktion und Carboxymethylierung inaktiviert. Bestandteile werden bei einem Lauf über die Biogelsäule abgetrennt.

Der nun inaktive Inhibitor wird mit Trypsin in Peptide gespalten. Die Peptide werden gelchromatographisch getrennt. Dünnschichtchromatographisch werden diejenigen Fraktionen identifiziert, die jeweils nur ein tryptisches Inhibitorpeptid in Reinform enthalten. Diese werden gefriergetrocknet und zur Aminosäuresequenzanalyse eingesetzt.

6.) Trypsinhemmtest

Er dient zur Bestimmung der gegen Trypsin gerichteten Hemmstoffaktivität. Eine Inhibitor milliunit (mIU) ist diejenige Inhibitor menge, die eine mIU eines bestimmten Zielenzymes zu hemmen vermag. Eine Trypsin milliunit bewirkt unter den angewandten Bedingungen mit N-alpha-Benzoyl-L-arginin-4-nitroanilid als Substrat eine Extinktionszunahme von $E_{405} = 0,066$ pro Minute bis 25°C. Die Verminderung der Extinktionszunahme um diesen Betrag bei Inhibitorzusatz zeigt eine Inhibitor milliunit an. Ansätze: 10 mIU Trypsin (bei dem verwendeten Präparat etwa 15 µg) in 0,0025 N HCl; 0,1-0,5 ml Inhibitorlösung; Triäthanolamin/HCl-Puffer pH 7,8 bis Endvolumen 2,0 ml. 1,0 ml Substrat gelöst in Wasser, Endkonzentration 73 µmol/l $\times \Delta E_{405}$ der ungehemmten Reaktion 0,066 pro Min.

7.) Elastasehemmtest

Er basiert auf dem gleichen Prinzip wie der Trypsinhemmtest. Zielenzym ist Pankreaselastase, als Substrat dient SucAlaAlaAlaNHp.

Darstellung von PI-8-E

100 IU PI-14, dargestellt wie in Kap. V/4 beschrieben, wurden in 50 ml 0,2 M Triäthanolamino-HCl-Puffer pH 7,8 gelöst, mit 200 mg Trypsin versetzt und 2 Std. bei 37°C inkubiert. Durch Zusatz von 10 Vol.% 1,67 N Perchlorsäure wurde die Reaktion gestoppt und der Inhibitor durch Denaturierung des Trypsins aus seinem Komplex freigesetzt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand mit 4 N KOH auf pH 7,8 eingestellt und vom Kaliumperchloratniederschlag dekantiert. Die Lösung wurde auf einer mit Trypsinsepharose gefüllten Säule gefiltert. Im Filtrat wurde die Antielastaseaktivität mit Pankreaselastase als Zielenzym und SucAlaAlaAlaNH₂ als Substrat nachgewiesen; antitryptische Aktivität konnte nicht nachgewiesen werden.

Zusammenfassung

Im Serum des Hausschweines wurde ein säurestabiler Inhibitor mit dem Molekulargewicht 30 000 nachgewiesen. Es kann gezeigt werden, daß dieser aus einem großmolekularen säurelabilen Proinhibitor hervorgeht. Sowohl aus dem Proinhibitor, wie auch aus dem säurestabilen Serum-inhibitor kann in vitro durch Einwirkung von Trypsin im Überschuß ein aktiver Inhibitor mit dem MG 14 000 freigelegt werden. Es handelt sich dabei um einen doppelköpfigen Inhibitor mit zwei aktiven Zentren, wovon eines Elastase- das andere Trypsinhemmwirkung zeigt. Diese beiden aktiven Zentren sind in zwei miteinander kovalent verbundenen Domänen lokalisiert. Die beiden Domäne konnten voneinander ohne Verlust ihrer Wirksamkeit getrennt werden. Von den entstehenden Minimalinhibitoren mit dem gleichen Molekulargewicht 8 000, zeigt der eine als PI-8 bezeichnete Hemmung von Trypsin, der als PI-8-E bezeichnete hemmt Elastase. Beim Vergleich mit den bekannten Daten dieses Inhibitorsystemes beim Menschen zeigte sich Übereinstimmung mit der Konzentration säurestabilen Serum-inhibitors, dessen Molekulargewicht und dem der Folgeprodukte PI-14 und PI-8. Aminosäurezusammensetzung und die teilweise Sequenzierung zeigten große Übereinstimmung zwischen HI-14 und PI-14. Neben einer deutlich geringeren Proinhibitor-konzentration unterscheidet sich der PI-14 vor allem durch seine im N-terminalen Domain lokalisierte Anti-elastaseaktivität, da beim Menschen für das analoge Domain ein Zielenzym noch nicht gefunden wurde.

Literaturverzeichnis

1. Hochstraßer K., Bretzel G., Feuth H., Hilla W., Lempart K.,
Hoppe-Seyler`s Z. Physiol. Chem. Bd.357, S.153-162, 1976
2. Bretzel G., Hochstraßer K.,
Hoppe-Seyler`s Z. Physiol. Chem. Bd.357, S.487-489, 1976
3. Hochstraßer K., Wachter E., Bretzel G.,
Hoppe-Seyler`s Z. Physiol. Chem. Bd.357, S.1659-1661, 1976
4. Hochstraßer K., Niebel J., Feuth H., Lempart K.,
Klin. Wschr. 55, 337-342, 1977
5. Hochstraßer K., Niebel J., Lempart K.,
Klin. Wschr. 55, 343-345, 1977
6. Hochstraßer K., Wachter E.,
Hoppe-Seyler`s Z. Physiol. Chem. Bd.360, S.1285-1296, 1979
7. Wachter E., Hochstraßer K., Bretzel G., Heindl S.,
Hoppe-Seyler`s Z. Physiol. Chem. Bd.360, S.1297-1303, 1979
8. Wachter E., Hochstraßer K.,
Hoppe-Seyler`s Z. Physiol. Chem. Bd.360, S.1305-1311, 1979
9. Dietl T., Dobrinski W., Hochstraßer K.,
Hoppe-Seyler`s Z. Physiol. Chem. Bd.360, S.1313-1318, 1979
10. Hochstraßer K.,
Atemwegs- u. Lungenkrankheiten, J.6, Nr.1/1980, S.1-4
11. Wingender W.,
Bayer-Symposium V, 548-559, Springer-Verl.1974

12. Greene L. J.,
Bayer-Symposium V, 560-561, Springer-Verl. 1974
13. Steiner R. F.,
Nature 204, 579, 1964
14. Steiner R. F.,
Biochem. BioPhys. Acta 100, 111, 1965
15. Janin J., Sweet R. M., Blcw D. M.,
Bayer-Symposium V, 513-520, 1974
16. Karlson P.,
Lehrbuch d. Biochemie, 8. Aufl. 1972
17. Rigbi M., Elkana Y., Segal N., Kliger D., Schwartz L.,
Bayer-Symposium V, 541-547, 1974
18. Heimbürger N.,
Bayer-Symposium V, 14-22, 1974
19. Sandson J., Hameran D., Schwick G.,
Trans. Ass. Amer. Pysicans 78, 304-313, 1965/66
20. Kueppers F., Fallat R. J.,
Clin. chim. Acta 24, 401-403, 1969
21. Fagerhol M. K.,
Pulmonary Emphysema and Proteolysis, New York-London
Ac.Press 72
22. Hochstrasser K., Schuster R., Reichert N., Heimbürger.,
Z. physiol. Chem. 353, 1120, 1973
23. Donaldson V., Evans R. R.,
J. Allergy 33, 316-329, 1962

24. Yin E. T., Wessler S., Stoll P. J.,
J. biol. Chem. 246, 3703-3719, 1971
25. Van der Meer J., Stoepman-van Dalen E. A.,
IVth Int. Congr. on Thrombosis and Haemostasis,
Wien, 1973, abstract p. 226
26. Odegard O. E., Abildgaard U., Gagerhol M. K.,
IVth Congr. on Thrombosis and Haemostasis,
Wien, 1973, abstract p. 225
27. Barret A. J., Starkey P. M.,
Biochem. J. 133, 709-724, 1973
28. Blatrix C., Amouch P., Drouet J., Steinbuch M.,
Path. Biol. 21, 11-14, 1973
29. Ohlsson K.,
Scan. J. clin. Lab. Invest. 28, 251, 1971
30. Shulman N. R.,
J. Biol. Chem. 213, 656-671, 1955
31. Astrup T., Alkajaer K., Soardi F.,
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 11, 181-184, 1959
32. Proksch G., Routh J. I.,
J. Lab. Clin. Med. 79, 491-499
33. Feuth H., Kemkes B., Hochstraßer K.,
Langenbecks ARch. Chir. Suppl. Chir. Forum, 133-136, 1975
34. Hochstraßer K., Feuth H.,
23rd Colloquium (Peeters, H., ed.) Pergamon Press,
in Print 1976

35. Kassel B., Laskowsky M. Sr., 1964, Biochem.Biophys.
Tes. Commun. 17, 792-796
36. Kato I., Kohr W. J. u. Laskowski M. Jr., 1978, in Regul.
Proteolytic Enzymes Proceedings of the 11th FEBS Meeting,
Pergamon Press.

Danksagung

Dank sagen möchte ich Herrn Prof. Dr. H. H. Naumann für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes;
Frl. K. Lempart und Frau Heindl für die labor-technische Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. K. Hochstraßer für die Überlassung des Themas, sowie für seine stets freundliche Art, mit der er mir bei der Bearbeitung mit Rat und Tat zur Seite stand.

Lebenslauf

Rudolf Schneider

geboren am 23.03.1950 in Passau

Eltern: Rudolf und Anna-Maria Schneider

1956

1963 - 1967 Staatl. Wirtschafts- und Handels-
schule Passau

Abschluß mit Mittlerer Reife

1967 - 1971 Adalbert-Stifter-Gymnasium in Passau,
Abitur

1971 - 1972 Wehrdienst in der Bundeswehr

1972 - 1978 Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-
Universität in München

1978 Medizinisches Staatsexamen in München

1978 Assistenzarzt am Städt. Krkh. Passau

1979 - 1981 Assistenzarzt am Kreiskrankenhaus in
Burghausen

